

Detecting plant materials in food by DNA amplification

Publication number: DE19745196

Publication date: 1999-04-15

Inventor: BEHRENS MEINHARD DR (DE); LATUS NORBERT (DE); EPPING BERND (DE)

Applicant: ALCUM GMBH (DE)

Classification:

- international: C12Q1/68; G01N27/447; G01N33/02; C12Q1/68; G01N27/447; G01N33/02; (IPC1-7): C07H21/04; C12Q1/68; G01N27/26

- European: C12Q1/68M10F; G01N27/447B3A2

Application number: DE19971045196 19971013

Priority number(s): DE19971045196 19971013

[Report a data error here](#)

Abstract of DE19745196

Detection of components of foods by DNA amplification using new primer pairs, and identification of selected DNA fragments by restriction analysis. The method comprises: (i) isolating total DNA from the sample; (ii) adding a pair of primers complementary to plant DNA for replication by polymerase chain reaction (PCR); (iii) fragmenting amplicons with restriction endonucleases; (iv) electrophoretic separation of the fragments; and (v) identifying type(s) of plants present from the pattern of fragments, by comparison with patterns of known identity. An Independent claim is included for the primer pair: 5'-ATAAGTTCAGTACCTTCACGAGCAAG (RBCL-C) 5'-ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGC (RBCL-N).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 197 45 196 A 1**

51 Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/04
C 12 Q 1/68
G 01 N 27/26

8
DE 197 45 196 A 1

21 Aktenzeichen: 197 45 196.9
22 Anmeldetag: 13. 10. 97
43 Offenlegungstag: 15. 4. 99

71 Anmelder:
Alcum GmbH, 33397 Rietberg, DE
74 Vertreter:
Hanewinkel, L., Dipl.-Phys., Pat.-Anw., 33102
Paderborn

72 Erfinder:
Behrens, Meinhard, Dr., 33330 Gütersloh, DE; Latus,
Norbert, 33397 Rietberg, DE; Epping, Bernd, 33332
Gütersloh, DE

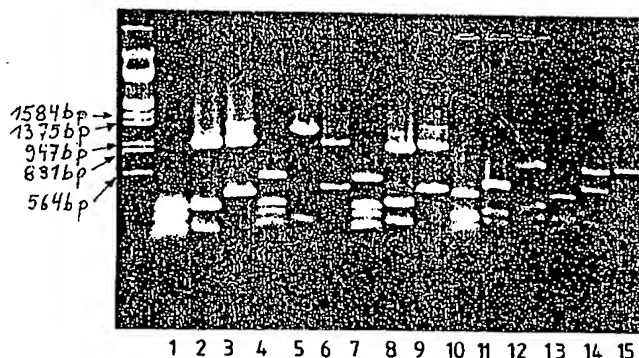
56 Entgegenhaltungen:
DE 1 96 29 166 A1
GB 23 10 718 A
WO 98 14 607 A1
WO 98 4 741 A1
Chem. Abstr. 124 (1996) 136773r;
Chem. Abstr. 123 (1995) 193350d;
GIT Fach & Lab. 4/96, 368-370;
Bot. Acta 108 (1995) 149-162;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Analyseverfahren für den Nachweis pflanzlicher Zusätze in Lebensmitteln

57 Mittels eines ausgewählten Primerpaares wird, ausgehend von isolierter pflanzlicher DNA oder von einer DNA-Mischung die pflanzliche DNA enthält, durch eine Polymerasekettenreaktion vervielfältigt und mit Restriktionsendonukleasen fragmentiert. Die DNA-Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt und anhand von Vergleichsmustern Pflanzenarten zugeordnet.
Das Primerpaar hat folgende Nukleotidsequenzen:
RBCL-C: 5'-ATA AGT TCA GTA CCT TCA CGA GCA AG-3'
RBCL-N: 5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC-3'
Eine hohe Nachweisempfindlichkeit auch thermisch behandelter Proben ist gegeben, z. B. 0,1% bis 10% Soja und 0,1% bis 10% Weizen.



DE 197 45 196 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Primerpaar sowie ein analytisches Verfahren zum Nachweis von pflanzlichen Lebensmittelbestandteilen anhand der darin wenigstens noch in Spuren vorhandenen Erbsubstanz DNA. Hierbei werden anhand solcher pflanzlichen DNA-Reste bestimmte DNA-Bereiche dieser DNA in vitro vervielfältigt und anschließend einer DNA-Restriktionsanalyse unterzogen. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich pflanzliche Zusätze, unabhängig von der Verarbeitung des Lebensmittels, mit hoher Empfindlichkeit nachweisen und eindeutig identifizieren.

In der lebensmittelverarbeitenden Industrie gewinnt die Verwendung pflanzlicher Zusätze, insbesondere in Form von Proteinen, zunehmend an Bedeutung. Derzeitig hat das Einbringen pflanzlicher Proteine in tierische Produkte wie Fleisch oder Wurstwaren zur Stabilisierung und zur Gewichtserhöhung sicherlich die größte Bedeutung, jedoch werden beispielsweise auch Pflanzenfasern als kalorienarmer Füllstoff oder zur Ballaststoffanreicherung eingesetzt. Insbesondere der Einsatz pflanzlicher Proteine wird aufgrund seiner vielfältigen funktionellen Eigenschaften, seiner biologischen Wertigkeit aber auch der im Vergleich zu Fleischiweiß geringen Produktionskosten eine zunehmende Anwendung im Lebensmittelbereich finden. Die Entwicklung des gemeinschaftlichen Lebensmittelrechts in der Europäischen Union läßt erwarten, daß Erzeugnisse mit Pflanzenzusätzen künftig vermehrt und ohne rechtliche Barrieren in Deutschland auf den Markt kommen. Daher ist für die Lebensmittelüberwachung eine Nachweismöglichkeit pflanzlicher Zusätze von enormem Interesse. Zur Zeit wird in der Lebensmittelanalytik für derartige Untersuchungen vorwiegend die Spezifität der Proteine herangezogen. Das bedeutet, die Analyse erfolgt mittels immunchemischer Methoden durch die Verwendung entsprechender Antikörper gegen pflanzliche Komponenten. Diese pflanzlichen Bestandteile gegen die die Antikörper gerichtet sind, sind jedoch durch Vorbehandlung der pflanzlichen Zusätze nicht mehr vorhanden oder nicht mehr intakt, so daß keine oder keine ausreichende Antikörper-Antigen-Wechselwirkung stattfinden kann und somit eine immunchemische Detektion schlecht oder gar nicht funktioniert.

Bereits Ende der 80er Jahre wurde von Baur et al. (1987) gezeigt, daß die Erbsubstanz DNA durch Hitze oder andere Verarbeitungsschritte und Zusatzstoffe nicht oder nur gering beeinflusst wird. Weiterhin hat Meyer et al. (DNA-Sonden zur Tierartidentifizierung in verarbeiteten Lebensmitteln, Fleischwirtschaft, 74 (11), 1237-1238, 1542-1551 (1994)) DNA-Sonden beschrieben, die für die Fleischidentifizierung der gängigen Fleischsorten eingesetzt werden können. Für den Nachweis und die Identifizierung pflanzlicher Zusätze in Lebensmitteln sind bis heute keine kommerziellen Nachweismethoden verfügbar.

Für den Nachweis pflanzlicher Zusätze, die unter Umständen nur geringen Mengen vorkommen oder in stark prozessiertem Untersuchungsmaterial nachzuweisen sind, sind solche DNA-Sonden aufgrund unzureichender Empfindlichkeit nicht geeignet. Hinzu kommt, daß die Probenaufarbeitung zur Isolation der Nukleinsäuren für Hybridisierungsverfahren sehr zeitaufwendig ist und diese Methode nur eine geringe Eignung zur Automatisierung besitzt. Somit sind kostengünstige Reihenuntersuchungen und schnelle Routinetests mit diesem Verfahren nicht möglich.

Es ist Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem sich Zusätze pflanzlicher Art anhand der darin befindlichen Reste pflanzlicher DNA einfach, schnell und mit hoher Empfindlichkeit eindeutig nachweisen lassen.

Die Lösung besteht in der Durchführung folgender

- Isolation der Gesamt-DNA aus dem Untersuchungsmaterial
- Einsatz eines Primerpaares, deren Primer komplementär zur nachzuweisenden pflanzlichen DNA sind
- Vervielfältigung der pflanzlichen DNA mittel Polymerasekettenreaktion
- Spaltung der vervielfältigten DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente
- Identifizierung der Pflanzenart anhand des DNA-Fragmentmusters

Vorteilhafte Ausgestaltungen sind in den Unteransprüchen angegeben. Ein geeignetes Primerpaar ist in den Nebenansprüchen spezifiziert.

Für die Identifizierung pflanzlicher DNA wurde ein plastidäres Gen gewählt, nämlich das RbcL-Gen, das für die große Untereinheit der Ribulose-1,5 biphosphat Carboxylase kodiert. Dies Gen spielt in der Natur bei der Photosynthese eine bedeutende Rolle und ist hochkonserviert. Dieser Umstand bietet den Vorteil, daß man mit einem einzigen Primerpaar für die Polymerasekettenreaktion (PCR, von polymerase chain reaction) die DNA verschiedenster Pflanzen amplifizieren kann, indem Primer Verwendung finden, die an Stellen binden, die eine größtmögliche Identität zu allen nachzuweisenden Pflanzen aufweisen. Der DNA-Bereich zwischen den beiden Primerbindungsstellen weist eine artspezifische Variabilität auf, so daß sich nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte eine artspezifisches DNA-Fragmentmuster zeigt und für die Identifizierung herangezogen werden kann.

Die Vorbehandlung des Probenmaterials durch Hitzeeinwirkung o. ä. hat bei dem neuen Verfahren nur einen sehr geringen Einfluß auf die Nachweisempfindlichkeit. Darüber hinaus erlaubt dieses Verfahren auch die Identifizierung der pflanzlichen Zusätze durch Vergleich der erhaltenen DNA-Restriktionsmuster mit entsprechenden Referenz-Fragmentmustern.

Anhand der Fig. 1-3 sind die Verfahren beispielhaft dargestellt.

Die Fig. 1 zeigt PCR-Produkte des RbcL-Gens von ganz unterschiedlichen Pflanzenarten.

Die Fig. 2a zeigt Restriktionsfragmentmuster der Pflanzenarten Soja, Tomate, Kartoffel, Weizen und Gerste, die Fig. 2b die Restriktionsfragmentmuster für Buchweizen, Hafer, Dinkel und Roggen im Vergleich.

Die Fig. 3a und 3b illustrieren die Nachweisempfindlichkeiten in thermisch unbehandelten und thermisch behandelten Proben.

Zur Demonstration der weitgehenden Universalität der erfindungsgemäßen Primer sind in Fig. 1 die PCR-Produkte verschiedener Pflanzenspezies aus ganz unterschiedlichen Pflanzenfamilien dargestellt. Der Abstand der von uns verwandten Primer führt zur Amplifizierung eines DNA-Fragmentes von etwa 1300 bp Länge und erlaubt aufgrund dieser Komplexität die Identifizierung der verschiedenen Arten anhand der erhaltenen DNA-Fragmentmuster nach enzymatischer Spaltung dieses PCR-Produktes. Das bedeutet, auch dieses hochkonservierte Gen verfügt über ausreichend artspezifische Sequenzen im amplifizierten DNA-Bereich, so daß sich bei der enzymatischen Spaltung artspezifische Fragmentmuster ergeben und somit eine eindeutige und sichere Identifizierung ermöglichen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von Restriktionsfragment-Längenpo-

lymorphismus (RFLP).

Die Fig. 1 zeigt beispielhaft die entsprechenden PCR-Produkte für die Pflanzenarten Weizen, Soja, Tomate, Roggen, Mais, Dinkel, Kichererbse und Haselnuß.

Die Fig. 2 zeigt exemplarisch die Unterscheidung zwischen Soja, Tomate, Kartoffel, Weizen, Gerste, Buchweizen, Hafer, Dinkel und Roggen anhand ihrer DNA-Fragmentmuster, die sich nach Spaltung mit entsprechenden Restriktionsenzymen ergeben. Zur Ermittlung der Nachweisesempfindlichkeit der PCR-Analytik wurden artifizielle Proben mit verschiedenen Weizen- bzw. Sojazugaben hergestellt und in mehrfachen unabhängigen Versuchen einer Identifizierung unterzogen. Weiterhin wurden die Proben sowohl thermisch unbehandelt (Fig. 3a) als auch thermisch behandelt (Fig. 3b) analysiert. Wie in dem Beispiel dokumentiert ist, lassen sich noch Proteinzumischen von nur 0,1% eindeutig nachweisen.

Beim beschriebenen Verfahren lassen sich vorteilhafterweise Standardtechniken der Gentechnologie wie DNA-Isolierung, PCR, Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese miteinander kombinieren. Die DNA-Isolierung erfolgt abhängig vom Untersuchungsmaterial, entweder durch einfaches Aufkochen der Probe, wobei für die PCR wenige Mikroliter des wässrigen Überstandes eingesetzt werden, oder aber durch Standard-DNA-Isolationsmethoden mit Hilfe von Zellaufschluß, Extraktion von Fett und Proteinen und anschließender Ausfällung der Nukleinsäuren. Aufgrund der Anwendung des Amplifikationsverfahrens PCR und den erfindungsgemäßen Primern RBCL-N und RBCL-C sind hohe Nachweisesempfindlichkeiten gegeben. Zwangsläufig brauchen auch nur geringe Mengen an Untersuchungsmaterial für die Isolation der Gesamt-DNA herangezogen werden, so daß die Zeit- und Kostenersparnis gegenüber herkömmlichen Verfahren erheblich ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist universell anwendbar, da aufgrund der Auswahl entsprechender Primer und der universellen Verbreitung dieses Zielfragmentes im Pflanzenreich eine dementsprechend breite Anwendung gegeben ist. Im Unterschied zu anderen Verfahren gemäß dem Stand der Technik, bei denen lediglich gezielt bestimmte Zumischungen pflanzlicher Herkunft erfaßt werden können, werden erfindungsgemäß auch nicht bekannte Beimengungen anhand der Restriktionsmuster erkannt.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Lebensmittelbestandteilen anhand der vorhandenen DNA durch Amplifizierung und Identifizierung ausgewählter DNA-Fragmente mittels Restriktionsanalyse, **dadurch gekennzeichnet**, daß folgende analytische Verfahrensschritte ausgeführt werden.

- Isolation der Gesamt-DNA aus der Probe
- Zusatz eines Primerpaares, deren weitgehend universelle Primer komplementär zur pflanzlichen DNA sind und somit die Vervielfältigung der pflanzlichen DNA mittels Polymerasekettenreaktion ermöglichen,
- Fragmentierung der vervielfältigten DNA mit Restriktionsendonukleasen,
- elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente,
- Identifizierung der Pflanzenart(en) anhand des DNA-Fragmentmusters im Vergleich mit Fragmentmustern bekannter Identität.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Vervielfältigung der pflanzlichen DNA mittels Polymerasekettenreaktion in der zu prüfenden

Probe folgende Primer eingesetzt werden:

RBCL-C: 5'-ATA AGT TCA GTA CCT TCA CGA GGA AG-3'

RBCL-N: 5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC-3'

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Zielgen für die genannten Primer und letztendlich für die Analyse das Gen für die große Untereinheit der Ribulose-1,5biphosphat Carb-oxylase (RbcL) ist.

4. Verfahren nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Fragmentierung der vervielfältigten DNA mit den Restriktionsendonukleasen AluI, HaeIII, HpaI, EcoRI, HindIII oder HinfI erfolgt.

5. Primerpaar zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es aus folgenden Primern besteht:

RBCL-C: 5'-ATA AGT TCA GTA CCT TCA CGA GCA AG-3'

RBCL-N: 5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC-3'

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

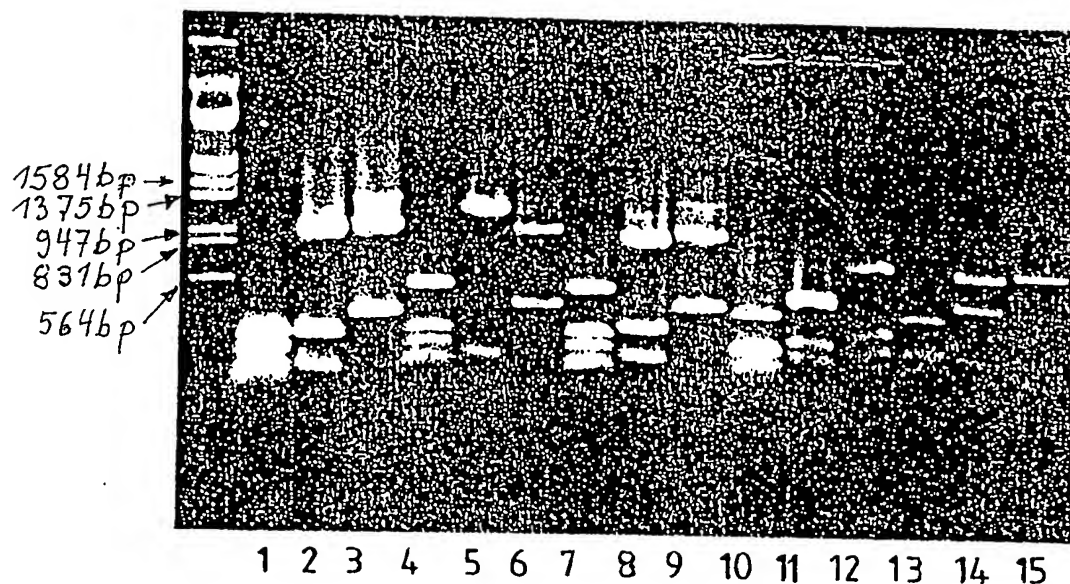


Fig. 2a

Fig. 2a: Restriktionsfragmentmuster von PCR-Produkten aus verschiedenen Pflanzen. Die beispielhaft aufgezeigten Arten und die eingesetzten Restriktionsendonukleasen bei der Erzeugung der Spaltnuster sind folgende. In den Spuren:

- 1) Soja, Alul, 2) Soja, HaeIII, 3) Soja, HpaII, 4) Tomate, Alul, 5) Tomate, HaeIII, 6) Tomate, HpaII,
- 7) Kartoffel, Alul, 8) Kartoffel, HaeIII, 9) Kartoffel, HpaII, 10) Weizen, Alul, 11) Weizen, HaeIII,
- 12) Weizen, HpaII, 13) Gerste, Alul, 14) Gerste, HaeIII, 15) Gerste, HpaII

Ganz links ist ein Lambda-Größenstandard aufgetragen.

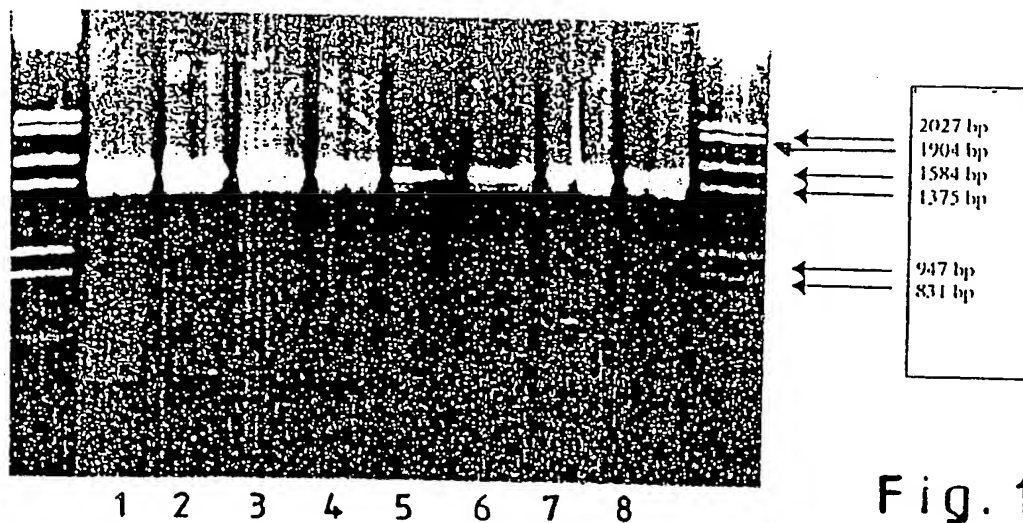


Fig. 1: PCR-Produkte des RbcL-Gens verschiedener Spezies aus unterschiedlichen Pflanzen-familien. In den Spuren: 1(Weizen), 2(Soja), 3(Tomate), 4(Roggen), 5(Mais), 6(Dinkel), 7(Kichererbse), 8(Haselnuß). In den Spuren M ist jeweils ein Lambda-Längenstandard aufgetrennt. Rechts neben dem Bild die Größen der Banden des Längenstandards.

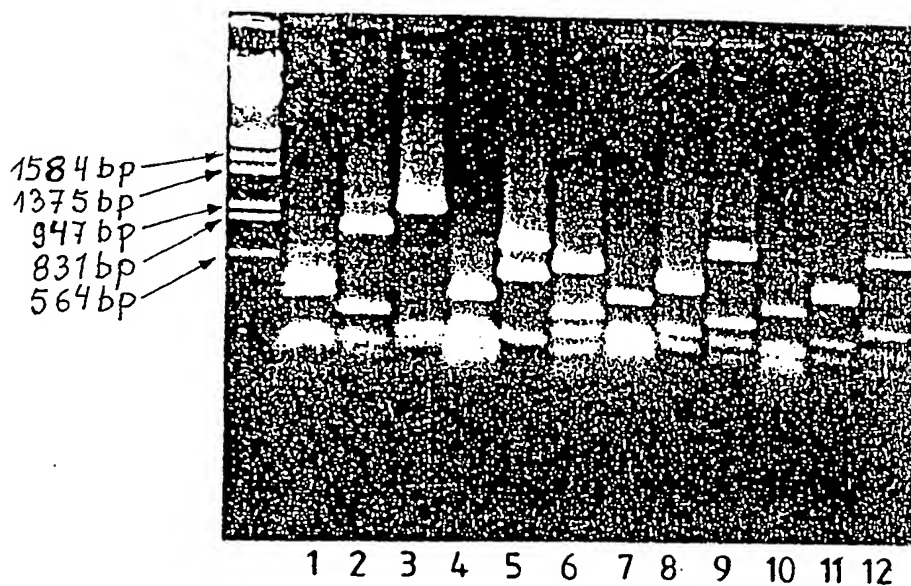


Fig. 2 b

Fig. 2b: Restriktionsfragmentmuster von PCR-Produkten aus verschiedenen Pflanzen. Die beispielhaft aufgezeigten Arten und die eingesetzten Restriktionsendonukleasen bei der Erzeugung der Spaltmuster sind folgende. In den Spuren:

- 1) Buchweizen, AluI, 2) Buchweizen, HaeIII, 3) Buchweizen, HpaII, 4) Hafer, AluI, 5) Hafer, HaeIII,
- 6) Hafer, HpaII, 7) Dinkel, AluI, 8) Dinkel, HaeIII, 9) Dinkel, HpaII, 10) Roggen, AluI, 11) Roggen,
- HaeIII, 12) Roggen, HpaII

Ganz links ist ein Lambda-Größenstandard aufgetragen.

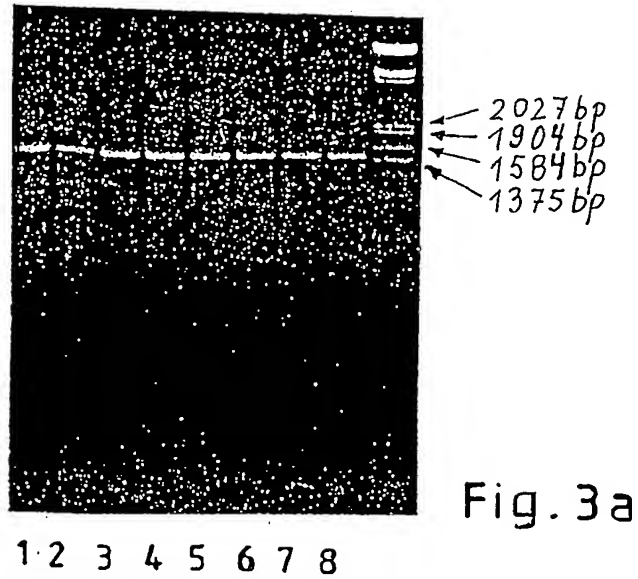


Fig. 3a: Nachweisempfindlichkeit pflanzlicher Proteinzugaben in thermisch unbehandelten Proben. PCR-Produkte folgender Soja- und Weizenmischungen sind gezeigt: 1) 0,1% Soja, 2) 1,0% Soja, 3) 5,0% Soja, 4) 10,0% Soja, 5) 0,1% Weizen, 6) 1,0% Weizen, 7) 5,0% Weizen, 8) 10,0% Weizen. In der Spur 9 ist ein Lambda-Größenstandard aufgetragen. Die Größen der Standardbanden sind rechts neben der Abbildung angegeben.

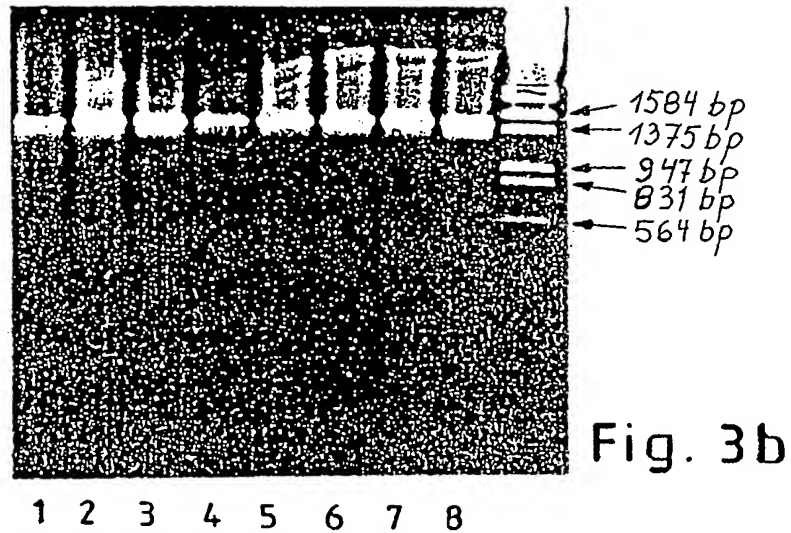


Fig. 3b: Nachweisempfindlichkeit pflanzlicher Proteinzugaben in thermisch behandelten Proben (30 Min. 100 Grad Celsius). PCR-Produkte folgender Soja- und Weizenmischungen sind gezeigt: 1) 0,1% Soja, 2) 1,0% Soja, 3) 5,0% Soja, 4) 10,0% Soja, 5) 0,1% Weizen, 6) 1,0% Weizen, 7) 5,0% Weizen, 8) 10,0% Weizen. In der Spur 9 ist ein Lambda-Größenstandard aufgetragen. Die Größen der Standardbanden sind rechts neben der Abbildung angegeben.